

耳石的微化學及魚類洄游環境史的研究

沈康寧¹、曾萬年²

1 國立台灣大學漁業科學研究所

2 國立台灣大學動物學系

耳石用於魚類年齡之判讀已行之多年 (Bagenal, 1974 ; Summerfelt and Hall, 1987)，但由耳石微量元素回推魚類洄游環境史，則是近幾年的發現 (Radtke and shafer, 1992)。本文主要在介紹耳石微量元素的測定原理及其在洄游環境史的研究。

耳石的構造

硬骨魚類之內耳迷路中有三對耳石，分別為扁平石 (Lapillus)、矢狀石 (Sagitta)、及星狀石 (Asteriscus)，其中以矢狀石為最大 (Fig. 1)。耳石的功能為平衡及聽覺。在高倍顯微鏡下，耳石呈現明暗交替之輪紋。明帶稱為成長帶 (Increment zone)，主要由碳酸鈣構成；而暗帶稱之為不連續帶 (Discontinuous zone)，主要由有機基質所構成。一明一暗形成的時間為一天，故稱之為日週輪 (Campana and Neilson, 1985)。自從 Pannella (1971) 發現這些日週輪後，魚類的定齡可準確到天的單位。明暗帶形成的時間因魚類的日週活動習性而異，日行性魚類白天形成明帶，晚上形成暗帶，夜行性則相反 (Campana, 1983 ; Mugia et al, 1981 ; Tanaka et al, 1981)。

耳石是如何形成的呢？Mugiya and Yoshida (1995) 的實驗結果發現，血液中之鈣離子經由細胞膜的鈣離子通道 (Ca channel) 或鈉鈣之交換 (Na-Ca exchanger) 等方式進入耳石囊腔，然後與碳酸根離子 (CO_3^{2-}) 結合形成耳石。耳石形成過程中，常常有一些元素會參雜在耳石中，例如鋇和鈣為同族元素，離子半徑相近，很容易透過鈣離子通道進入耳石。魚類耳石中的鋇含量和水域環境中鋇含量呈正比，而海水中鋇含量比淡水高甚多。因此，由魚類耳石中所記錄的鋇-鈣比，便可回推海陸兩側

洄游性魚類的生活史 (Kalish, 1990 ; Radtke and Kinzie, 1996 ; Secor, 1992 ; Tzeng and Tsai, 1994) 。

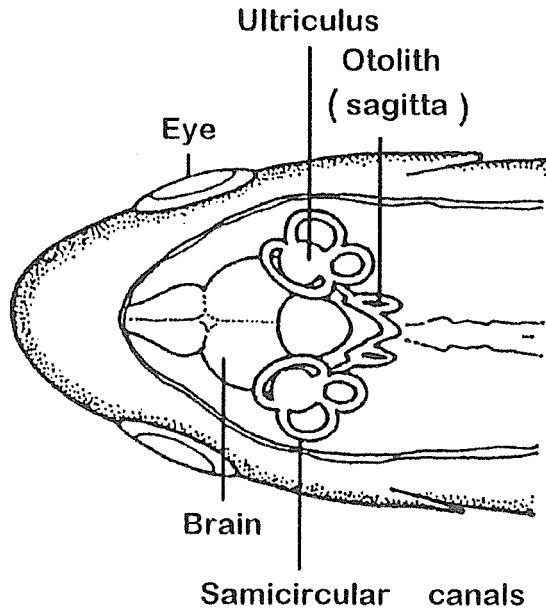


Fig.1 硬骨魚的內耳結構以及耳石 (矢狀石) 的位置 (King, 1995)

微量元素分析方法

(1) 耳石之製備

在解剖顯微鏡下，以鑷子取出耳石，經酒精清洗、100℃乾燥、樹脂包埋後，以不同顆粒大小之砂紙及氧化鋁粉加以研磨，研磨至核心出現、表面光滑為止，再置入烤箱中乾燥，最後在高真空下鍍上約 500 Å 厚的碳，就是一個可供耳石微化學分析的樣本 (Fig. 2)。詳細過程可參照 Tzeng (1990) 及 Tzeng and Tsai (1994)。

(2) X 射線 (X-rays) 顯微分析的基本原理

耳石的體積很小，而且記錄於耳石中之微化學成份具有時間性，因此只能利用電子微探分析儀 (Electron Probe Microanalyser, 簡稱 EPMA) 在耳石切面上打點來測定微量元素的時間序列變化 (Tzeng, 1996)。在高真空環境下，以高能電子束 (Electron beam) 撞擊耳石剖面時，測定點上的各元素的電子軌道 (Electron orbital,)

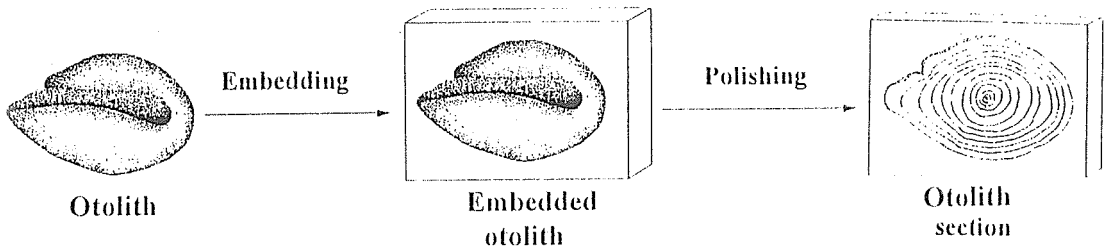


Fig.2 耳石樣本製備過程 (仿 Secor et al. 1991a)

由內而外依次為K、L、M、N及O層)的電子,若受到電子束撞擊就會被激發而脫離原來的軌道形成離軌電子 (Ejected orbital electron)。此時外層較高能階上的電子會自發性地替補到內層軌道的空位上,使原子系統能量驅於穩定,同時釋放出能量,於是產生特定波長之X射線。X射線和可見光一樣都是一種電磁輻射波,但其波長比可見光短,約為 $0.01-100\text{\AA}$ 。通常電子束撞擊耳石樣本時會產生兩種X射線,一為特徵X射線 (Characteristic X-ray),一為連續X射線 (Continuum X-ray) (Fig. 3)。連續X射線與可見光的白光相似,稱之為白X射線,產生的過程是當入射電子

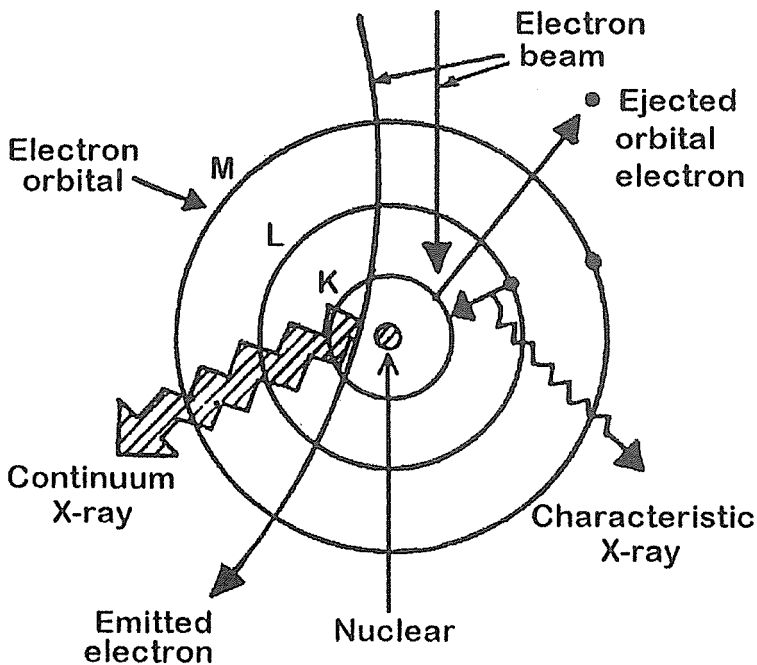


Fig.3 特徵X射線 (Characteristic X-ray) 及連續X射線 (Continuum X-ray) 的形成 (林, 1989)

在原子核附近通過時，在原子核庫倫場（Coulomb field）作用下，發生不完全的彈性散射以致入射電子改變方向，形成散射電子（Emitted electron），並損失能量，這時所產生的X射線不是該元素所特有的，因此不具元素分析之功能，只是形成分析特徵X射線的背景值（Background）；而特徵X射線具有一定波長，與可見光的單色光相似，故可用來分析耳石中的元素種類及含量。不同層的電子在替補離軌電子時所產生的特徵X射線是不同的，L層電子替補到K層時所釋放出之特徵X射線稱為 $K\alpha$ X射線；M層電子替補到K層稱之為 $K\beta$ X射線；由M層替補到L層則稱之為 $L\alpha$ X射線，以此類推。其中 $K\alpha$ X射線的強度最強， $K\beta$ X射線的強度約為 $K\alpha$ X射線的20%，在分析時愈強的X射線愈是容易偵測（Fig. 4）。一般原子序（Z）小於35的元素多用K系列（ $K\alpha$ 、 $K\beta$ ）及L系列的X射線， $Z > 35$ 的元素則採用L系列及M系列的X射線（李，1989）。舉例來說：鈣的原子序為20，故以 $K\alpha$ 線來分析，分析之波長為 3.358 \AA ；而鋇原子序為38，故以 $L\alpha$ 線來分析，分析之波長為 6.863 \AA 。因為每種元素的電子能階不同，所以釋放出來的特徵X射線的波長和能量也不同。電子微探儀之偵測器（Detector）可偵測到這些不同波長的元素種類及其強度，和已知濃度之標準物比對後，便可得到所欲測定的元素之含量。當沿著耳石核心至邊緣測定時，便可知道該元素在耳石形成過程中的時間序列變化。

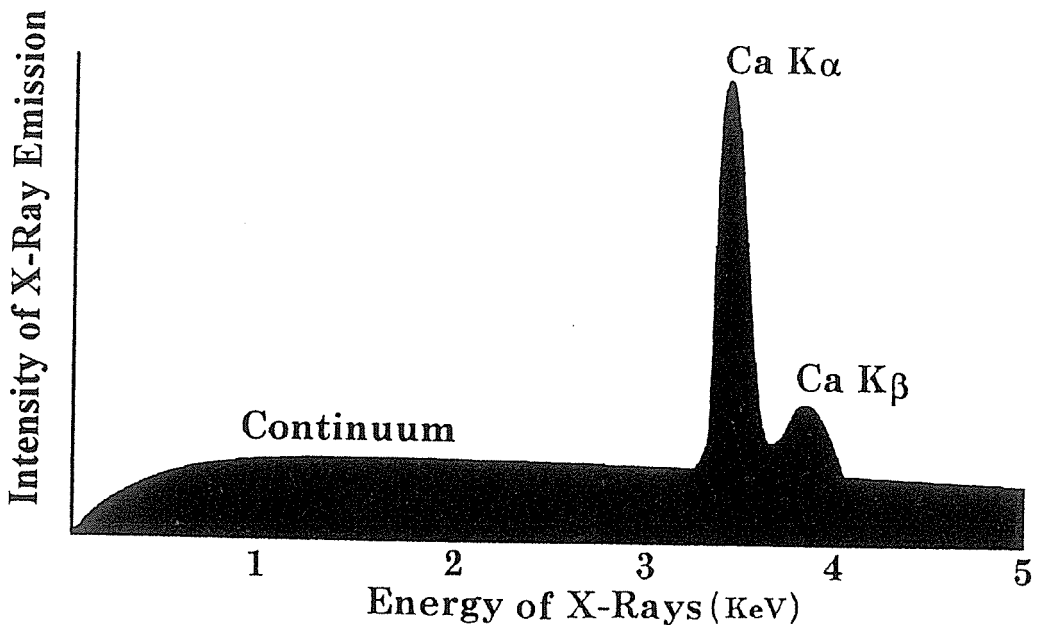


Fig.4 鈣原子之X射線光譜。Ca $K\alpha$ 、Ca $K\beta$ 為鈣的特徵X射線強度，連續X射線（Continuum X-ray）的強度為背景值。（Lee, 1993）

耳石鋸-鈣比在魚類洄游環境史的研究

耳石鋸鈣比在魚類洄游環境史的研究，最成功的例子就是海陸兩側洄游性魚類。依出生、生長及生殖區域的不同，兩側洄游性魚類可分為三種類型：第一為溯河型（Anadromous）：在淡水中出生，在海水中成長，再回到淡水生殖，如鮭魚。第二為降海型（Catadromous）：在海水中出生，在淡水中成長，再回到海水生殖，如鰻魚。第三種兩棲洄游型（Amphidromous）在淡水（海水）出生，在海水（淡水）成長一段時間後進入淡水（海水）成長，在淡水（海水）中生殖，如一些鰻虎魚。Fig. 5 就是上述魚類的洄游模式圖。以下就簡單介紹耳石鋸鈣比在這三種洄游性魚類的研究結果：

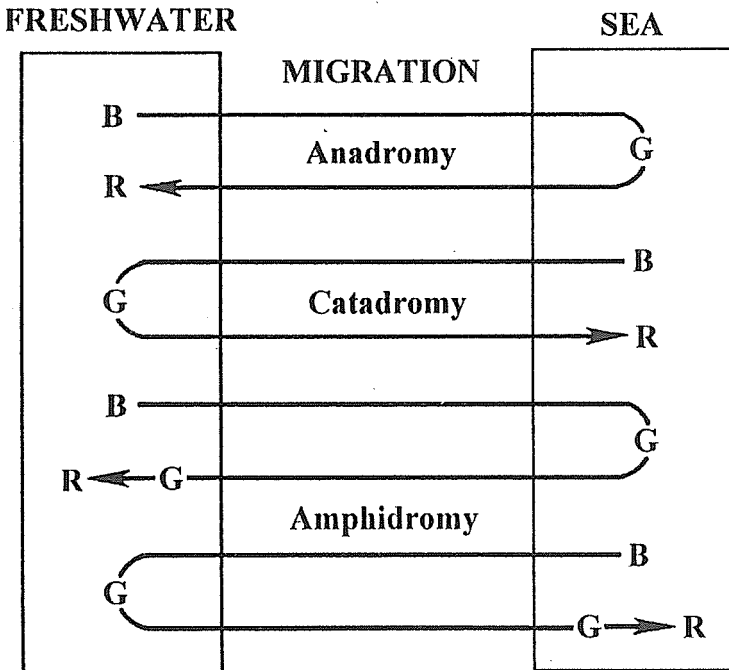


Fig.5 溯河型（Anadromous）、降海型（Catadromous）及兩棲洄游型（Amphidromous）魚類的生活史示意圖。三型的出生（B）、成長（G）以及生殖（R）的環境互異。（McDowall, 1987）

(1) 溯河型魚類：虹鱒（*Oncorhynchus mykiss*）為溯河型魚類，但部份族群是屬於非溯河型（non-anadromous），兩型魚類外形相似，但生活史不同。Kalish(1990)

利用耳石鋇鈣比的測定結果來探討區分這兩型魚的可行性。結果發現海水飼養的虹鱒（湖河型），耳石鋇鈣比上升至 0.002-0.003（Fig.6A），一生均在淡水中生活的虹鱒（非湖河型），鋇鈣比則維持在 0.002 以下（Fig.6B）。故由耳石鋇鈣比的變化應該可以了解鮭鱒魚類的生活史。

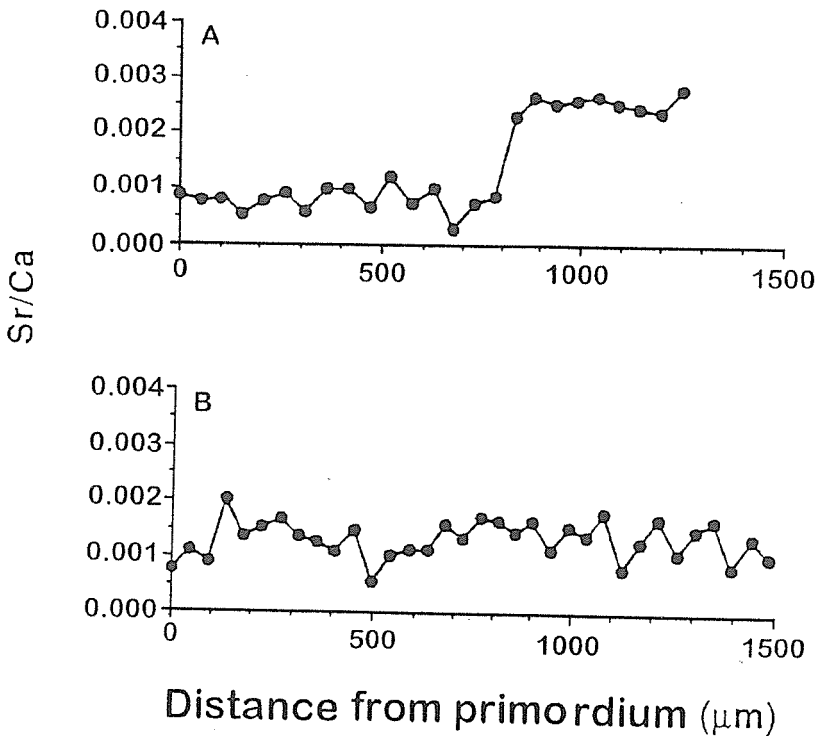


Fig.6 虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 耳石鋇鈣比的時間序列變化圖。
 (A) 湖河型 (anadromous), (B) 非湖河型 (non-anadromous)。
 (Kalish, 1990)

(2)降海型魚類：最主要的例子就是鱘魚，鱘魚在海中產卵，卵孵化後逐漸發育成柳葉型的仔鱘，然後順著洋流漂送，進入沿岸地區，接近大陸棚時變態成鱘線再溯河進入淡水中生活。Fig. 7 是鱘線耳石鋇鈣比的時間序列變化，可看出生活於海水的柳葉鱘，耳石鋇鈣比較高，進入淡水後的鱘線鋇鈣比明顯下降。鱘線耳石核心的鋇鈣比較低，是因為母魚在卵黃合成 (Vitellogenesis) 時期，生活於淡水環境所致。配和耳石的日齡查定，還可以知道鱘魚的變態時間 (Tzeng, 1995)。

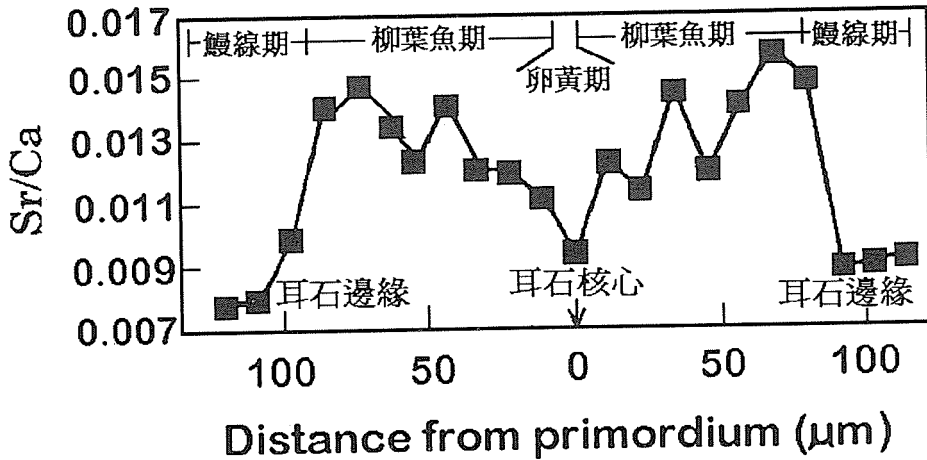


Fig.7 鰓線耳石鋇鈣比的時間序列變化圖。(改自 Tzeng and Tsai, 1994)

(3)兩棲洄游型魚類：鰕虎魚 (Gobids) 可分為海洋型、淡水型及洄游型。Radtko and Kinzie (1996) 分析這三型鰕虎魚耳石的鋇鈣比，發現海洋型鰕虎魚 (*Bathygobius coalitus*) 鋇鈣比較高，介於 4.6-8.1 之間 (Fig. 8a)；兩棲洄游型的鰕虎魚 (*Lentipes concolor*)，在海洋浮游期時，介於 2.5-4.9 之間，進入淡水後降低為 0-1.3 (Fig. 8b)；淡水型鰕虎魚 (*Xiphophorus helleri*) 鋇鈣比較低，介於 0.4-1.1 之間 (Fig. 8c)。由此證明夏威夷本島 Akaka 瀑布上游的 *Lentipes concolor* 是屬於兩棲洄游型，而非陸封型 (Landlocked form)，早期生活於海洋，然後再溯河至河川上游。

結 語

利用耳石來測定年齡，在魚類的生活史、生物學及族群動態之研究甚為重要，如今再配合微化學分析，對於魚類的生態及棲息環境有了深一層的認識。相信，今後耳石微化學分析在魚類生活史的研究，還會有更多的發現。

參考文獻

- Bagenal, T.B. ed.1974. The ageing of fish. Unwin, London, 234 pp. Campana, S. E. 1983. Feeding periodicity and the production of daily growth increments in otoliths of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and starry flounder (*Platichthys stellatus*) Can. J. Zool. 61: 1591-1597.

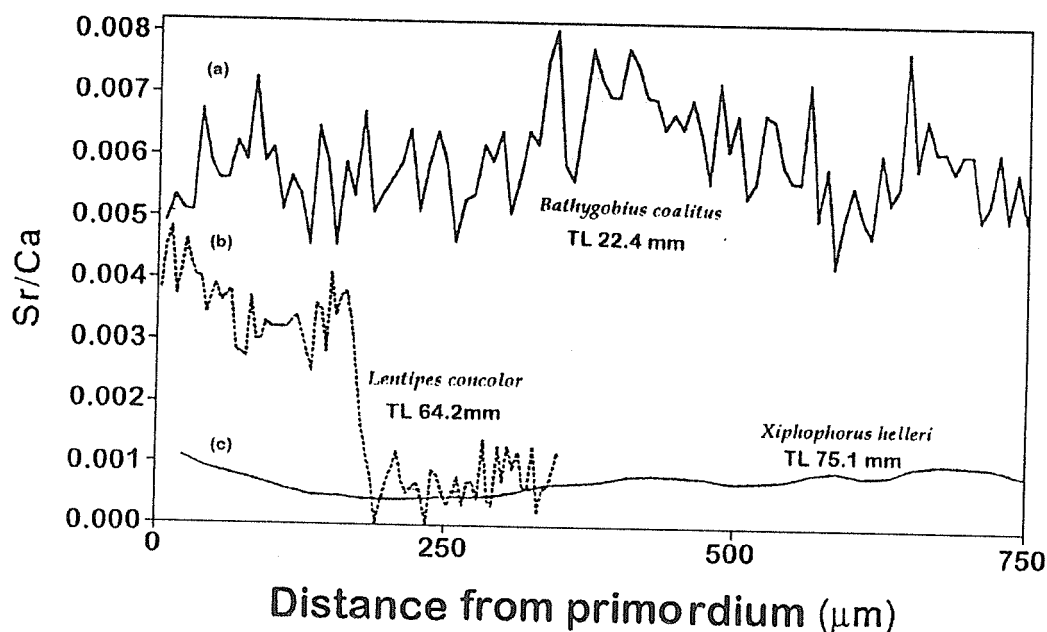


Fig.8 三種不同生活史的鰻虎魚耳石鋇鈣比的時間序列變化圖。
 (a) 海洋型鰻虎魚 (*Bathygobius coalitus*) ; (b) 兩棲洄游型鰻虎魚 (*Lentipes concolor*) 及 (c) 淡水型鰻虎魚 (*Xiphophorus helleri*) ; TL, 表捕獲時的體長。(Radtke and Kinzie, 1996)

- Campana, S. E. and Neilson J. D. 1985. Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1014-1032.
- Degens, E. T., Deuser, W. G. and Haedrich, R. L. 1969. Molecular structure and composition of fish otoliths. *Mar. Biol.* 2: 105-113.
- Kalish, J. M. 1990. Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and non-anadromous salmonids. *U. S. Fish. Bull.* 88: 657-666.
- King, M. G. 1995. *Fisheries Biology, Assessment and Management*. Fishing News Books, Oxford. p46.
- Lee, R. E. ed. 1993. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. p138.
- Mugiya, Y. 1995. Effects of calcium antagonists and other metabolic modulators on in vitro calcium deposition on otoliths in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* 61 (6): 1026-1030.

- Mugiya, Y., Watabe, N., Yamada, J., Dean, J. M., Dunkelberger, D. G. and Shimizu, M. 1981. Diurnal rhythm in otolith formation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68(A): 659-662.
- Radtke, R. L. 1984. Cod fish otoliths : information storage structures. In 'The Propagation of Cod *Gadus morhua* (E. Dahl, D. S. Danielssen, E. Moksness and P. Solendal. eds.) , Flodevigen Rapporster. 1, 273-98. Radtke, R. L. 1989. Strontium-calcium concentration ratios in fish otoliths as environmental indicators. *Comp. Biochem. Physiol.* 92A: 189-193.
- Radtke, R. L. and Shafer, D. J. 1992. Environmental sensitivity of fish otolith microchemistry. *Aus. J. Mar. Freshw.* 43: 935-951.
- Radtke, R. L., Kinzie III, R. A. 1996. Evidence of a marine larval stage in endemic Hawaiian stream gobies isolated high-elevation locations. *Trans. Am. Fish. Soc.* 125:613-621.
- Secor, D. H. 1992. Application of otolith microchemistry analysis to investigate anadromy in Chesapeake Bay striped bass *Morone saxatilis*. *U. S. Fish. Bull.* 90: 798-806.
- Secor, D. H., Dean, J. M. and Laban, E. H. 1991. Manual for Otolith Removal and Preparation for Microstructural Examination. Electric Energy Research Institute and the Belle W. Baruch Institute for Marine Biology and Coastal Research, University of south Carolina, Columbia, South Carolina, 85pp.
- Summerfelt, R. C. and Hall, G. E. ed. 1987. Age and growth of fish. Iowa State University Press, Ames, 544 pp.
- Tanaka, F. W., Mugiya, Y. and Yamada, J. 1981. Effects of photoperiod and feeding on daily growth patterns in otoliths of juvenile *Tilapia nilotica*. *U.S. Fish. Bull.* 79: 459-466.
- Tzeng, W. N. 1995. Migration history recorded in otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonicus*, elvers as revealed from SEM and WDS analyses. *Zool. Studies.* 34: 234-236.
- Tzeng, W. N. 1996. Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium : calcium ratios in otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonicus* Temminck and Schlegel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 199: 111-122.
- Tzeng, W. N. and Tsai Y.C. 1994. Changes in otolith microchemistry of the Japanese eel, *Anguilla japonicus*, during its migration from the ocean to the rivers of Taiwan. *J. Fish. Biol.* 45: 671-683.
- 林鈞安主編. 1989. 實用生物電子顯微術. 環宇科學技術出版社. p38-41.